

石榴汁对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的作用

吴淑娟¹, 王新军², 张武胜², 孟卫红², 夏禹承¹, 张润光¹, 张有林^{1,*}

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119;

2. 陕西潼关县红宝石榴农民专业合作社, 陕西 渭南 714300)

摘要: 溃疡性结肠炎是一种发病机制尚不明确且难以根治的慢性病, 在我国发病率逐年升高, 其药物治疗依赖性较强, 副作用明显, 因此寻求天然营养疗法成为人们的关注热点。本研究采用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 建立小鼠溃疡性结肠炎模型, 用美沙拉嗪 (130 mg/(kg m_b · d)) 和石榴汁 (30%、100% (体积分数), 10 mL/d) 进行干预, 检测小鼠体质量、疾病活动指数 (disease activity index, DAI)、结肠长度, 采用试剂盒检测小鼠肝肾功能指标及氧化应激水平, 采用酶联免疫吸附剂测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测炎症因子水平, 并对结肠组织切片观察, 采用气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 分析小鼠粪便短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 含量, 综合评价石榴汁对小鼠溃疡性结肠炎的作用及其机制。结果发现: 与DSS组相比, 石榴汁干预组小鼠体质量和结肠长度增加、DAI降低、肝肾功能改善, 促炎因子表达量极显著降低 ($P < 0.01$), 抗炎因子表达量极显著提升 ($P < 0.01$), 氧化应激水平及炎症标志物髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活力极显著降低 ($P < 0.01$), 粪便SCFAs含量上调, 结肠上皮结构改善。石榴汁能改善小鼠肠黏膜损伤和肝肾功能障碍, 对DSS诱导的小鼠溃疡性结肠炎具有良好的治疗作用。

关键词: 石榴汁; 葡聚糖硫酸钠; 小鼠结肠炎; 作用机制

Effect of Pomegranate Juice on Dextran Sulfate Sodium Salt-Induced Ulcerative Colitis in Mice

WU Shujuan¹, WANG Xinjun², ZHANG Wusheng², MENG Weihong², XIA Yucheng¹, ZHANG Runguang¹, ZHANG Youlin^{1,*}

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China;

2. Shaanxi Tongguan County Ruby Soft Seed Pomegranate Farmers' Professional Cooperatives, Weinan 714300, China)

Abstract: Ulcerative colitis is a chronic inflammatory bowel disease with unclear pathogenesis and is difficult to cure. The incidence rate is increasing year by year, and there is high drug dependence for the treatment of ulcerative colitis, which leads to obvious the treatment resistance to side effects. Therefore, seeking natural health products for nutritional therapy has become an attention focus of attention. In this article study, dextran sulfate sodium salt (DSS) was used to establish a mouse model of ulcerative colitis. The mice were intervened with 5-aminosalicylic acid (5-ASA) (130 mg/(kg m_b · d)) or pomegranate juice (30% and 100%, 10 mL/d). Body mass, disease activity index (DAI) and colon length were measured, liver and kidney function and oxidative stress were measured by biochemical kits, the levels of inflammatory factors were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), colon tissue sections were observed, and the contents of fecal short-chain fatty acids (SCFAs) were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Finally, a comprehensive evaluation of the effect and mechanism of pomegranate juice against ulcerative colitis in mice was explored performed. Compared with the DSS group, body mass and colon length in the pomegranate juice intervention group was increased, DAI was decreased, liver and kidney functions were improved, and could the expression of proinflammatory factors was significantly decreased ($P < 0.01$). In addition, anti-inflammatory factor expression was significantly

收稿日期: 2022-07-12

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2022NY-018); 中央财政林业科技推广示范项目 (SLTG[2021]04号);

陕西省林业科学院科技创新计划专项 (SXLK2021-0232)

第一作者简介: 吴淑娟 (1996—) (ORCID: 0000-0003-2281-4542), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品开发。

E-mail: wsj18434760860@163.com

*通信作者简介: 张有林 (1956—) (ORCID: 0000-0001-5881-2018), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏及加工。

E-mail: youlinzh@snnu.edu.cn

enhanced ($P < 0.01$), reduce the level of oxidative stress and the activity of inflammatory marker myeloperoxidase (MPO) were significantly reduced ($P < 0.01$), the level of up-regulate fecal SCFAs was up-regulated, and improve the colonic epithelial structure was improved. Pomegranate juice can attenuate intestinal mucosal damage and liver and kidney dysfunction, and has a good therapeutic effect on DSS-induced ulcerative colitis in mice.

Keywords: pomegranate juice; dextran sulfate sodium; colitis in mice; mechanism

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220712-120

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)13-0088-09

引文格式:

吴淑娟, 王新军, 张武胜, 等. 石榴汁对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的作用[J]. 食品科学, 2023, 44(13): 88-96.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220712-120. <http://www.spkx.net.cn>

WU Shujuan, WANG Xinjun, ZHANG Wusheng, et al. Effect of pomegranate juice on dextran sulfate sodium salt-induced ulcerative colitis in mice[J]. Food Science, 2023, 44(13): 88-96. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220712-120. <http://www.spkx.net.cn>

结肠炎是一种由细菌、真菌感染或遗传、免疫及环境等多种因素引发的炎症性肠病, 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病^[1]。其中, UC 主要表现为腹痛、腹泻、便血等症状, 伴随强烈的氧化应激和细胞炎症因子的聚集, 且病程长、易反复, 长期的慢性炎症状态易引发结肠癌及其他相关疾病^[2], 多数研究认为其发病机制与各因素共同作用引起的中性粒细胞增生、肠黏膜屏障损伤、促炎因子过度表达及肠道菌群异常免疫反应^[3-5]有关。目前主要通过生物制剂、免疫调节剂等药物治疗^[6], 但药物治疗往往表现出长期依赖、暂时愈合及不可预测的副作用, 因此利用天然产物的营养疗法逐渐受到人们的关注和青睐^[7-9]。

石榴 (*Punica granatum* L.) 被誉为“天下奇果”, 因其富含碳水化合物、氨基酸、多酚、黄酮类化合物等营养物质, 在传统医学中具有很高的药食两用价值。据报道, 石榴具有抗氧化、抗炎、抗菌、预防心血管、糖尿病及神经性系统疾病^[10-12]等多种功能。Yang Jieping 等^[13]报道石榴提取物可通过调节结肠炎相关基因及盲肠微生物组成减轻白细胞介素-10 (interleukin-10, *IL-10*) 基因敲除小鼠的结肠炎症状; George 等^[14]发现石榴皮提取物中高浓度的多酚可以减轻铬引起的肠道内环境紊乱; Parisio 等^[15]分别利用石榴的全煎剂、多糖、鞣花单宁处理结肠炎 SD 大鼠, 发现三者均能显著减少由 2,4-二硝基苯磺酸引发的结肠变化。石榴汁、石榴皮、石榴渣三者的多酚组成相似, 但石榴汁具有更高的抗氧化活性^[16]。Seeram 等^[17]发现由于协同效应石榴汁表现出优于单纯安石榴苷或鞣花酸的生物活性。石榴富含营养物质, 对人体具有多种有益作用。然而, 目前关于石榴汁缓解结肠炎的作用机理以及防御功能的研究较少。本实验通过研究石榴汁对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导小鼠结肠炎的防御作用, 旨在为利用石榴汁营养疗法治疗炎症性肠病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

健康 SPF (无特定病原体) 级雌性昆明小鼠, 6~8 周龄, 体质量 20~25 g, 购于西安交通大学医学部实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (陕) 2018-001。

突尼斯软籽石榴购于陕西省渭南市潼关软籽石榴试验站。

IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、谷草转氨酶 (aspartate amino transferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、肌酐 (creatinine, CR)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、NO 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; 其他化学试剂均为分析纯, 购于西安晶博化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Velocity 18R 型高速冷冻离心机 英国 Dynamica 公司; DW-HL438 型超低温冰箱 合肥美菱股份有限公司; 1530 型多功能酶标仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; BY-TR 型光学显微镜 重庆奥特光学仪器有限公司; 8890-5977B 型气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 仪 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 石榴汁的制备

以突尼斯软籽石榴为原料, 通过清洗、去皮、护色液

(0.01% (体积分数, 下同) VC、0.3%柠檬酸)护色、榨汁、酶解(果胶酶添加量0.09%, 酶解温度40 °C, 酶解时间120 min)、灭酶(90 °C灭酶10 min)、过滤离心得到石榴汁, 4 °C贮存备用。

1.3.2 小鼠实验

取12只雌性昆明小鼠, 于温度20~22 °C、相对湿度60%、24 h明暗交替的环境下自由饮食进水, 适应性喂养7 d后随机分为2组, 分别为对照组(Normal组)和模型组(DSS组), 每组6只。DSS组每日自由饮用3 g/100 mL的新鲜DSS溶液, 连续9 d, 对照组饮用无菌水。观察小鼠的精神状况并检测小鼠血清炎症因子表达。

取30只雌性昆明小鼠, 适应性喂养7 d后随机分为5组, 分别为对照组(Normal组)、模型组(DSS组)、美沙拉嗪阳性对照组(5-ASA组)、石榴汁低剂量组(LPJ组)、石榴汁高剂量组(HPJ组), 每组6只。除对照组外, 其余各组均给予3 g/100 mL DSS溶液, 连续9 d自由饮用, 每日更换新鲜DSS溶液, 造模成功后5-ASA组按照人与动物等效体表面积剂量关系灌胃美沙拉嗪肠溶片(5-ASA, 130 mg/(kg m_b · d)), LPJ组和HPJ组分别自由饮用30% (体积分数, 下同)和100%的石榴汁10 mL/d, 对照组和DSS组饮用无菌水。对造模后的小鼠干预14 d后解剖并测定相应指标, 实验周期共23 d。

1.3.3 疾病活动指数测定

每3 d记录一次小鼠体质量, 并观察小鼠活动状况、精神状态、粪便性状, 测定小鼠粪便隐血, 按下式计算疾病活动指数(disease activity index, DAI)。DAI评判值及相应评判标准见表1。

$$DAI = \frac{\text{体质量下降评判值} + \text{粪便性状评判值} + \text{大便隐血评判值}}{3}$$

表1 小鼠DAI评判值及相应评判标准
Table 1 DAI values and its standard in mice

评判值	体质量下降率/%	粪便性状	大便隐血
0	0	正常	阴性
1	1~5	略松散	弱阳性
2	6~10	松散	阳性
3	11~20	半成型稀	强阳性
4	>20	稀便	血便

1.3.4 血清生化指标及炎症因子水平测定

最后一次饲喂结束后, 小鼠禁食不禁水12 h, 采用150~300 mg/kg戊巴比妥酸钠注射进行安乐死, 腹腔主动脉取血, 静置30 min, 3 000 r/min、4 °C条件下离心10 min收集血清。取上清液按试剂盒说明书测定小鼠血清ALT、AST、CR、BUN水平, 酶联免疫吸附剂测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平。

1.3.5 结肠氧化应激因子及MPO、NO水平测定

解剖小鼠结肠组织, 用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗, 按照结肠与PBS质量体积比1:9冰浴匀浆待用。按照试剂盒方法分别测定结肠氧化应激因子MDA、SOD、GSH-Px和MPO、NO水平。

1.3.6 组织病理学观察

取新鲜结肠组织用质量分数4%多聚甲醛溶液固定24 h, 乙醇梯度脱水后石蜡包埋切片, 脱蜡后分别用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和阿利新蓝染液染色并封片, 干燥后在显微镜下观察结肠组织形态。

1.3.7 粪便短链脂肪酸含量测定

粪便短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)含量的测定参照Wang Guoliang等^[18]的方法。SCFAs是含1~6个碳的饱和脂肪酸, 对肠道健康起重要的作用。取0.1 g小鼠粪便样品与1 mL磷酸溶液(0.1%)涡旋混匀, 4 °C、15 000 \times g条件下离心10 min, 移取上清液并与乙酸乙酯按照体积比1:1提取, 乙酸乙酯萃取相过0.45 μ m滤膜, 用DB-WAX毛细管柱(30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m)进行GC-MS分析。

1.4 数据处理与分析

使用SPSS 23.0软件进行方差分析和Tukey多重比较检验, 数据以平均值 \pm 标准差($n=6$)表示, 以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。使用Origin 8.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 小鼠溃疡性结肠炎模型构建

根据炎症因子的表达能准确判断机体的炎症状态, 由表2可以看出, 模型组小鼠自由饮用DSS溶液9 d后, 均出现溏便、血便症状, DAI极显著升高($P<0.01$), 各促炎因子的表达水平平均约是对照组的2倍, 表明饮用DSS成功诱导了小鼠结肠炎, 造模成功。

表2 小鼠炎症因子表达水平

Table 2 Expression levels of inflammatory factors in mice

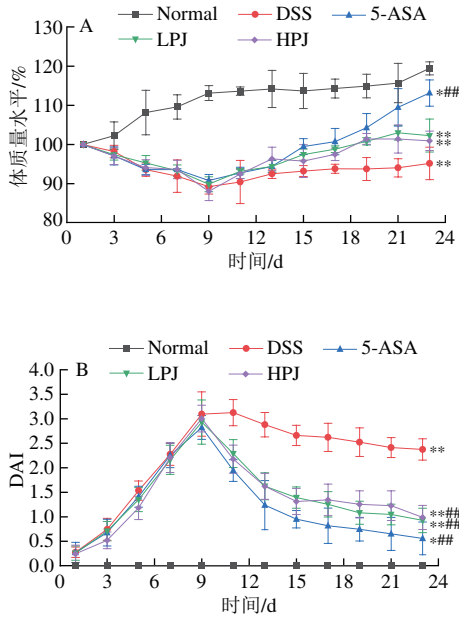
指标	对照组	模型组
DAI	0	3.10 \pm 0.45**
IL-1 β 质量浓度/(pg/mL)	37.47 \pm 5.26	90.20 \pm 5.65**
IL-6质量浓度/(pg/mL)	24.72 \pm 2.38	52.56 \pm 1.96**
TNF- α 质量浓度/(pg/mL)	313.82 \pm 28.55	560.65 \pm 28.11**
IFN- γ 质量浓度/(pg/mL)	503.87 \pm 63.31	1 029.60 \pm 46.57**

注: **与对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

2.2 石榴汁对结肠炎小鼠体质量和DAI值的影响

由图1可以看出, 对照组小鼠在实验期间体质量呈现

平稳上升趋势, 其余各组在饮用DSS溶液9 d内体质量持续下降, 给予美沙拉嗪和石榴汁后小鼠体质量减轻症状有所缓解, 但LPJ、HPJ组小鼠体质量与DSS组相比无明显差异, 可能是石榴汁抑制了胰脂肪酶的活性, 降低了肠道对食物能量的摄取^[19]。与DSS组相比, 各干预组小鼠的DAI极显著下降 ($P < 0.01$), 表明石榴汁在一定程度上缓解了DSS引起的小鼠结肠炎症状。



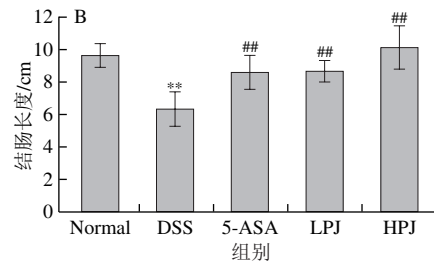
*、**、***分别表示与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)、差异极显著 ($P < 0.01$)；#、##、###分别表示与DSS组比较差异显著 ($P < 0.05$)、差异极显著 ($P < 0.01$)。图2~6、9同。

图1 石榴汁对结肠炎小鼠体质量 (A) 及DAI (B) 的影响

Fig. 1 Effect of pomegranate juice on body mass (A) and DAI (B) in mice with colitis

2.3 石榴汁对结肠炎小鼠结肠长度的影响

小鼠结肠长度的变化可以作为评判结肠炎症的一项重要指标^[20]。由图2可以看出, DSS组小鼠结肠长度较其他各组极显著缩短 ($P < 0.01$), 5-ASA、LPJ、HPJ组小鼠结肠长度接近对照组, 其中HPJ组结肠更长, 且肠内容物呈现健康的黑色状态, 表明饮用石榴汁可以缓解由DSS引起的小鼠结肠长度缩短。



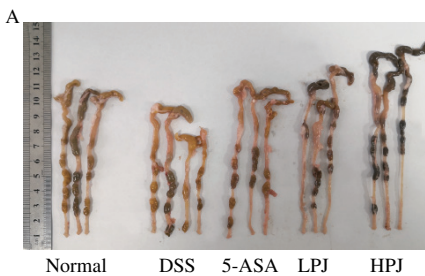
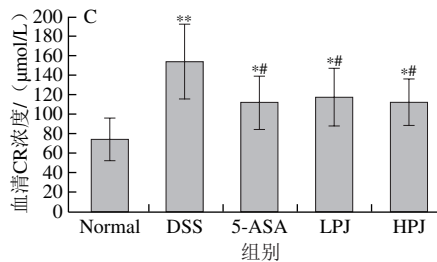
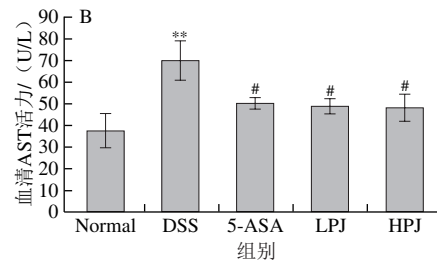
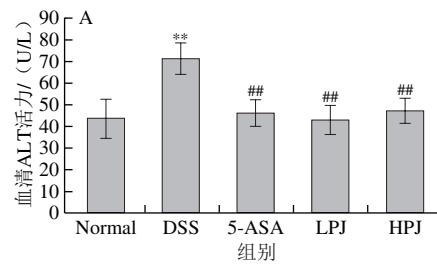
A.结肠形态; B.结肠长度。

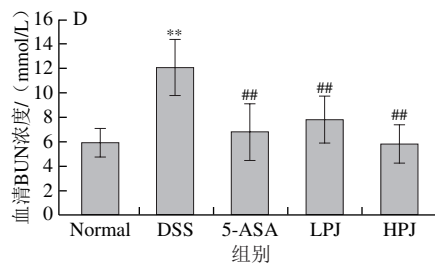
图2 石榴汁对结肠炎小鼠结肠长度的影响

Fig. 2 Effect of pomegranate juice on colon length in mice with colitis

2.4 石榴汁对结肠炎小鼠肝肾功能的的影响

溃疡性结肠炎以及用于治疗溃疡性结肠炎的药物能引起肝肾受损^[21], ALT、AST均可由肝细胞分泌, 当肝细胞出现炎症及损伤时, 它们能以极高的敏感度进入血清, 因此其水平可以用于指示机体损伤; CR和BUN水平与肾功能及其受损程度密切相关, 其升高可指示肾功能障碍。由图3可以看出, 与对照组相比, DSS组的ALT、AST活力和CR、BUN浓度均极显著升高 ($P < 0.01$), 表明DSS会引起肝肾损伤并发症; 与DSS组相比, 5-ASA、LPJ、HPJ组上述指标水平均得到较好的改善, LPJ、HPJ组与对照组总体无显著差异 ($P > 0.05$), 说明饮用石榴汁对肾功能有一定的保护作用。





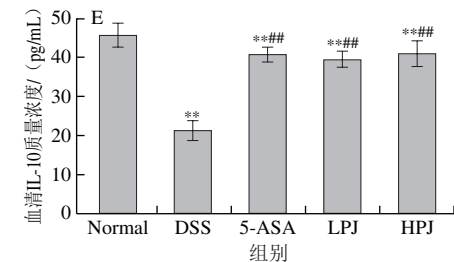
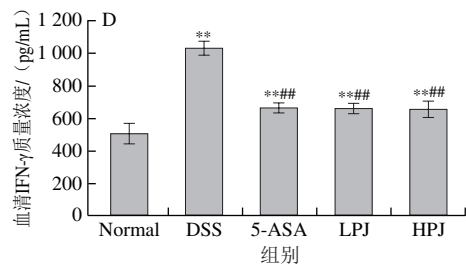
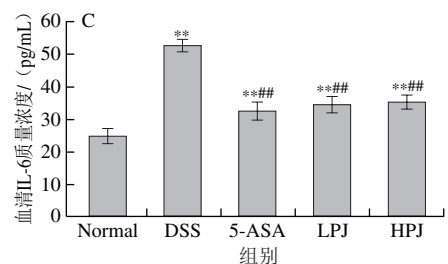
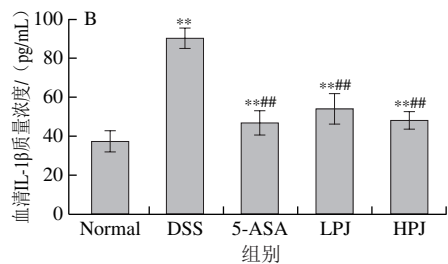
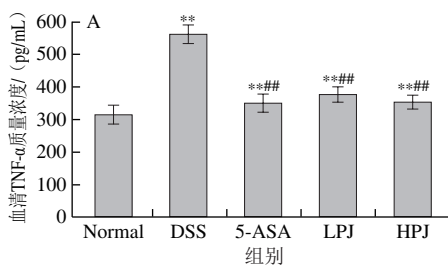
A. ALT; B. AST; C. CR; D. BUN.

图3 石榴汁对结肠炎小鼠肝肾功能的影响

Fig. 3 Effect of pomegranate juice on liver and kidney functions in mice with colitis

2.5 石榴汁对结肠炎小鼠血清炎症因子表达的影响

促炎因子水平的升高及抗炎因子水平的降低是结肠炎的典型特征^[22], 可反映结肠炎的发展进程及严重程度。由图4可以看出, 与对照组相比, 经DSS处理后小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 质量浓度均极显著升高 ($P < 0.01$), 抗炎因子IL-10质量浓度极显著下降 ($P < 0.01$); 给予阳性药物 (5-ASA组) 和石榴汁 (LPJ、HPJ组) 干预后, 炎症因子的表达水平得到改善, LPJ和HPJ组与5-ASA组表现出相同的变化趋势, 表明石榴汁可以通过降低促炎因子的表达及提高抗炎因子的水平, 缓解由DSS引起的结肠炎症。



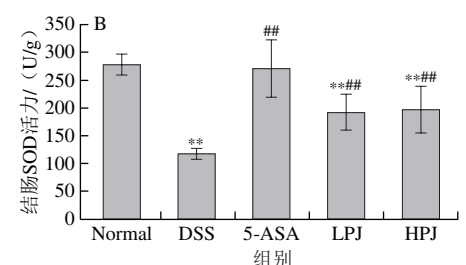
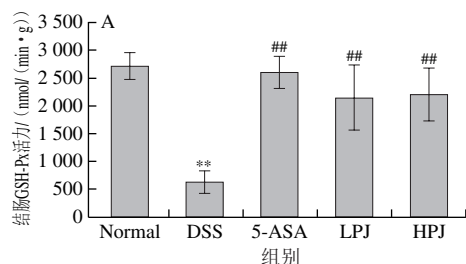
A. TNF- α ; B. IL-1 β ; C. IL-6; D. IFN- γ ; E. IL-10.

图4 石榴汁对结肠炎小鼠血清炎症因子水平的影响

Fig. 4 Effect of pomegranate juice on serum inflammatory factors level in mice with colitis

2.6 石榴汁对结肠炎小鼠结肠氧化应激水平的影响

炎症因子的过度表达会加剧机体的氧化应激^[23], 而抗氧化酶类可以消除由炎症引起的过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 减轻ROS对机体的氧化胁迫。由图5可以看出, 与对照组相比, DSS组小鼠结肠组织的GSH-Px和SOD活力极显著降低 ($P < 0.01$), MDA的释放量极显著增加 ($P < 0.01$), 表明DSS处理的小鼠结肠组织细胞出现破坏和凋亡, 机体稳态失调。5-ASA组和石榴汁组小鼠机体的GSH-Px和SOD活力均极显著升高 ($P < 0.01$), MDA的释放量均极显著降低 ($P < 0.01$), LPJ和HPJ组表现出较好的调节作用, 表明饮用石榴汁能缓解由DSS引起的结肠氧化应激。



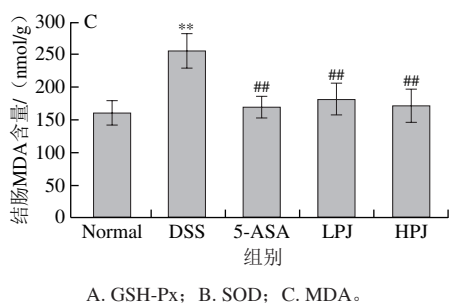


图5 石榴汁对结肠炎小鼠氧化应激水平的影响

Fig. 5 Effect of pomegranate juice on oxidative stress levels in mice with colitis

2.7 石榴汁对结肠炎小鼠结肠MPO活力及NO浓度的影响

MPO主要存在于嗜中性粒细胞中，是组织中性粒细胞浸润的生物标志物，它的异常表达会加重结肠组织黏膜的损伤^[24]。NO与炎症性肠病发病机制相关，可以作为结肠炎的重要生物标志物^[25]。由图6可以看出，与对照组相比，DSS组的结肠MPO活力和NO浓度均极显著升高 ($P < 0.01$)，表明DSS能引起结肠组织损伤及炎症性细胞浸润；与DSS组相比，5-ASA组和LPJ、HPJ组结肠MPO活力和NO浓度均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，LPJ、HPJ组与对照组无显著差异，表明饮用石榴汁能缓解DSS引起的结肠组织损伤和炎症性细胞浸润。

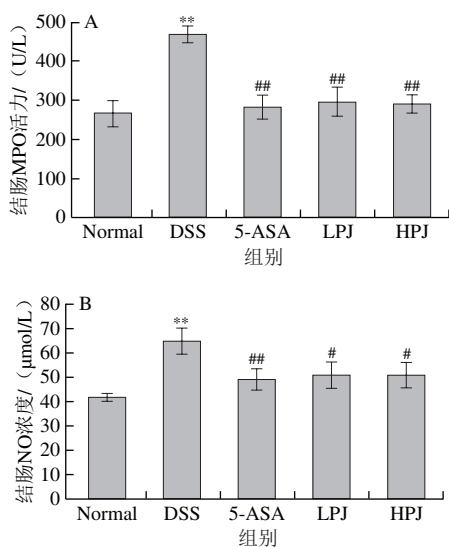


图6 石榴汁对结肠炎小鼠MPO活力(A)及NO浓度(B)的影响

Fig. 6 Effect of pomegranate juice on MPO activity (A) and NO content (B) in mice with colitis

2.8 石榴汁对结肠炎小鼠结肠HE染色及杯状细胞数量的影响

由图7可以看出，对照组结肠上皮细胞及黏膜隐窝结构完整、排列整齐，无炎症细胞浸润。DSS组结肠组织出现腺体萎缩，黏膜损伤，多处表现出上皮细胞脱落及炎症细胞浸润，且存在大量淋巴细胞聚集，肠绒毛变短。

与DSS组相比，5-ASA组和LPJ、HPJ组隐窝结构趋于正常，上皮结构趋于完整，腺体数量明显增多，绒毛变长。杯状细胞可以分泌黏液，能够润滑和保护肠上皮，黏液中的黏蛋白可以被阿拉新蓝染液染成蓝色，用于判断结肠黏液层的完整性^[26]。由图8可以看出，相比对照组，DSS组杯状细胞明显减少，且体积不一，表明DSS处理损坏了小鼠的肠黏膜层结构。经石榴汁干预后，LPJ、HPJ组杯状细胞数量明显增多，排列紧密有序，表明石榴汁能有效缓解结肠炎引起的杯状细胞减少，减轻肠黏膜损伤。

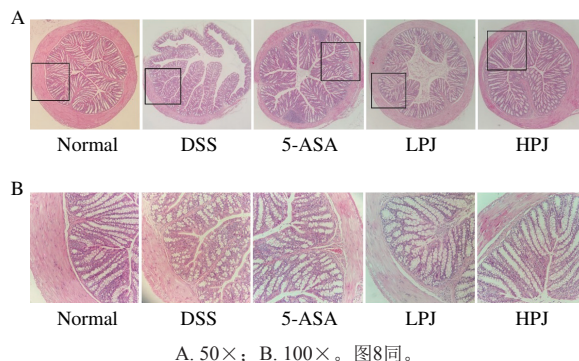


图7 石榴汁对结肠炎小鼠结肠组织切片的HE染色图
Fig. 7 Microscopic images of HE stained colonic tissue sections of mice with colitis treated with pomegranate juice

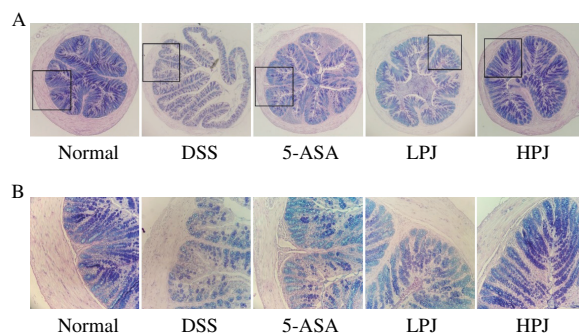
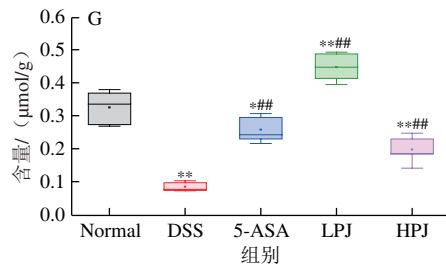
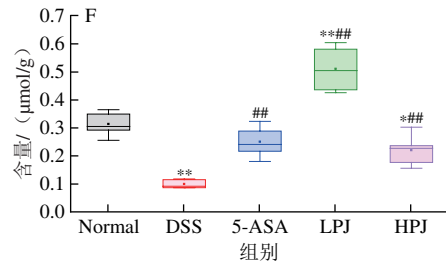
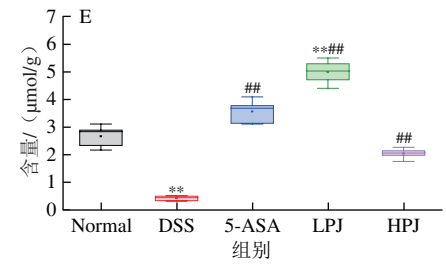
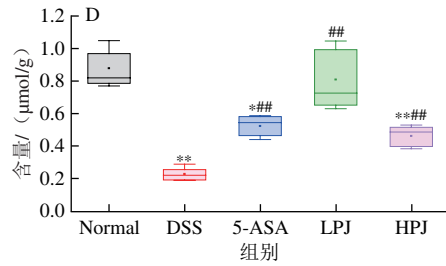
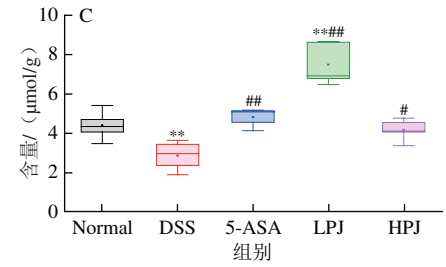
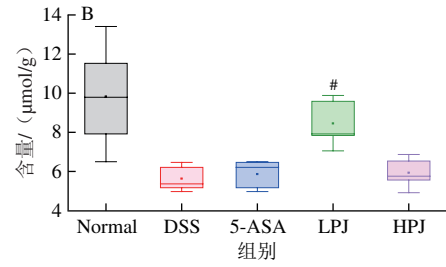
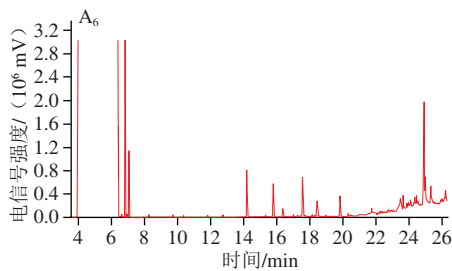
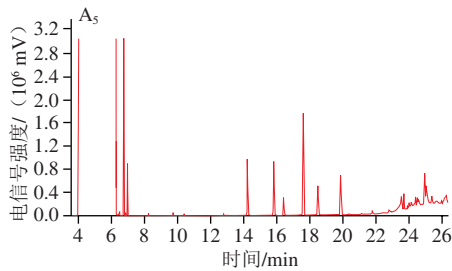
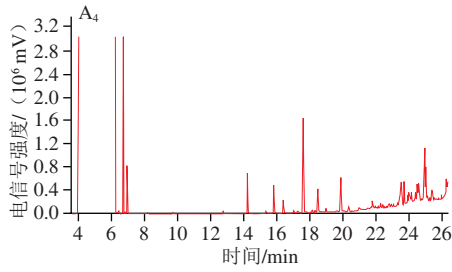
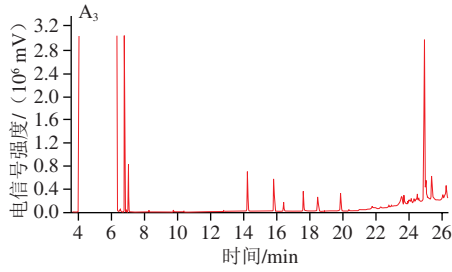
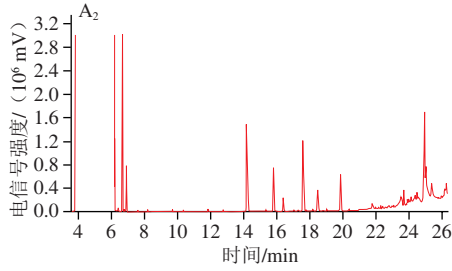
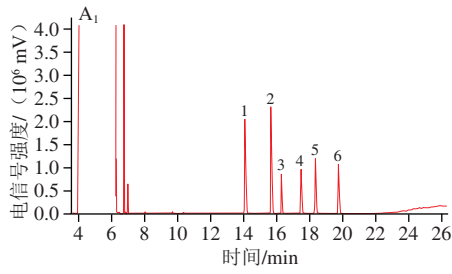
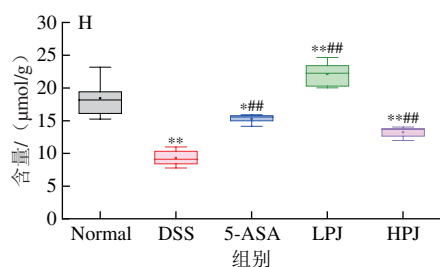


图8 石榴汁对结肠炎小鼠结肠杯状细胞数量的影响
Fig. 8 Effect of pomegranate juice on the number of colonic goblet cells in mice with colitis

2.9 石榴汁对结肠炎小鼠粪便SCFAs含量的影响

SCFAs由肠道内相关有益菌属产生，对维持肠道稳态及正常功能有积极意义。由图9可以看出，与对照组比较，DSS组小鼠的粪便中除乙酸外的其余5种SCFAs及总SCFAs含量均极显著降低 ($P < 0.01$)，表明DSS成功诱导造成了小鼠肠道环境紊乱；LPJ组小鼠粪便SCFAs与DSS组相比均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，除乙酸和异丁酸外，其余4种SCFAs含量均高于对照组，表明石榴汁干预不仅可以缓解DSS诱导结肠炎引发的SCFAs含量下降，还能使其含量高于正常对照组，通过维持肠道内稳态平衡缓解由DSS诱导的结肠炎。





A₁~A₆ 6种短链脂肪酸标准品的GC-MS图, 1~6分别为乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸; A₇~A₈分别为对照组、DSS组、5-ASA组、LPJ组、HPJ组小鼠SCFAs含量GC-MS图; B~H分别为各实验组乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和总SCFAs含量。

图9 石榴汁对结肠炎小鼠粪便SCFAs组成及含量的影响

Fig.9 Effect of pomegranate juice on the compositions and contents of SCFAs in the feces of mice with colitis

3 讨论

结肠炎的发生发展与肠道微生态激发的氧化应激及免疫应答密切相关^[27], 发病期间, 活化的嗜中性粒细胞产生大量ROS和活性氮, 使MDA、NO浓度升高, 导致脂质过氧化, 同时降低抗氧化酶的活性, 进一步加剧机体氧化应激反应^[28]。有研究表明, 空肠和结肠上皮细胞中足够的GSH-Px、SOD能通过消除有害的过氧化物以防止组织损伤和降解^[29]。本研究结果显示, 经美沙拉嗪或石榴汁干预后, 小鼠结肠的GSH-Px、SOD活力均显著提高, MDA、NO释放量均显著降低, 这在一定程度上减轻了自由基和NO对肠黏膜的破坏作用, 缓解了DSS诱导的结肠组织损伤。机体内辅助性T细胞(helper T cell, TH1)免疫反应是细胞介导的促炎反应, 与炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α、IFN-γ等的分泌有关, 而TH2主要与抗炎因子(如IL-10)的分泌有关, 结肠炎发生时TH1/TH2紊乱的免疫应答会使结肠产生不受控制的组织损伤^[30]。本研究结果显示, 经DSS诱导后小鼠的促炎因子分泌显著增加, 抗炎因子分泌显著减少, 使用美沙拉嗪或石榴汁干预的小鼠与DSS组相比促炎因子分泌显著降低, 抗炎因子分泌显著增加, TH1/TH2免疫应答趋于平衡, 石榴汁组表现出良好的治疗效果, 但LPJ组和HPJ组无明显差异, 同时结肠组织病理切片也观察到相同的趋势, 这与Zhao Ruiqi等^[31]的研究结果一致, 即饮用石榴汁可以通过平衡机体内TH1/TH2免疫应答, 缓解炎症因子介导的结肠组织损伤, 修复结肠黏膜屏障, 但并不遵循剂量-效应关系。

有研究表明, 结肠炎的发生发展与肠道微生物菌群密切相关, 如粪杆菌的存在与结肠炎的发病率呈负相关^[32], 乳酸杆菌和拟杆菌的生长有助于肠道黏膜屏障的修复^[33]。SCFAs由肠道微生物菌群产生, 对于肠道炎症性

疾病具有重要影响, 其中丁酸由梭状芽孢杆菌属产生^[34], 其作为肠上皮细胞能量底物的同时还能通过抑制炎症细胞因子级联反应发挥抗炎作用^[35]。本研究结果显示, 除乙酸外, 石榴汁干预组小鼠的其他SCFAs含量均显著增加, 其中低剂量的石榴汁比高剂量表现出更好的效果, Zhao Ruiqi等^[31]在研究石榴皮提取物对大鼠肠道微生物菌群的作用时也发现低剂量干预效果更好的现象, 这可能是小鼠在饮用过多石榴汁的同时也增加了糖的摄入, 影响了代谢产物组成及含量^[36]。但高剂量石榴汁干预的小鼠在日常活动及血清生化指标等方面并没有显示出毒性迹象, 且对小鼠各项生化指标及SCFAs组成及含量显示出有益效果。饮用石榴汁可以通过调节SCFAs的组成及含量维持肠道内稳态, 缓解DSS诱导的结肠炎症状。

石榴富含多酚、黄酮类化合物、花青素等抗氧化活性物质, 其中多酚类物质被报道具有较好的抗炎作用。尹珊珊等^[37]利用从石榴皮中提取的安石榴苷干预溃疡性结肠炎小鼠, 发现其能激活SIRT1/PGC-1α/NRF1通路介导的抗炎、抗氧化和抗蛋白凋亡保护路径, 改善结肠黏膜的病理损伤。鞣花酸也被证明对结肠炎症具有改善作用^[38], 其作用机制可能与调节肠道菌群、改善肠道环境有关^[39], 但研究过程并未排除石榴中其他成分如糖、纤维等物质的影响。此外, 石榴多糖在结肠炎引起的慢性内脏疼痛方面也有类似石榴多酚的疗效, 多糖虽效力不如多酚, 却能与多酚表现出协同增强作用^[15]。由此可见, 石榴汁中的多酚、多糖及其他营养物质对DSS诱导的小鼠溃疡性结肠炎均具有一定贡献, 其作用机制与降低生物机体内氧化应激、平衡免疫应答、改善肠道环境有关。

4 结论

本研究以DSS诱导的结肠炎小鼠为模型, 探究石榴汁及其饮用量对结肠炎的改善作用。造模后小鼠的DAI、炎症因子表达量均显著升高, 表明小鼠结肠炎模型建造成功; 对造模小鼠给予石榴汁干预, 小鼠结肠炎症状减轻, 炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α、IFN-γ的表达量降低, 氧化应激水平降低, 经切片观察, 结肠组织上皮及隐窝结构完整、杯状细胞数量增多, SCFAs含量增加。综上, 小鼠饮用石榴汁对由DSS诱导的小鼠结肠炎有显著的缓解和改善作用。

参考文献:

[1] 杨小冰, 金明玉, 吴小禾, 等. 膳食营养素与炎症性肠病关系研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 309-315. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180129-404.

[2] LIU C, YAN X J, ZHANG Y J, et al. Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy[J]. Journal of

- Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 206. DOI:10.1186/s12951-022-01421-w.
- [3] LIU T C, STAPPENBECK T S. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2016, 11(1): 127-148. DOI:10.1146/annurev-pathol-012615-044152.
- [4] SOEHNLEIN O, STEFFENS S, HIDALGO A, et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation[J]. Nature Reviews Immunology, 2017, 17(4): 248-261. DOI:10.1038/nri.2017.10.
- [5] CADER M Z, KASER A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation[J]. Gut, 2013, 62(11): 1653-1664. DOI:10.1136/gutjnl-2012-303955.
- [6] LI M X, LI M Y, LEI J X, et al. Huangqin decoction ameliorates DSS-induced ulcerative colitis: role of gut microbiota and amino acid metabolism, mTOR pathway and intestinal epithelial barrier[J]. Phytomedicine, 2022, 100: 154052. DOI:10.1016/j.phymed.2022.154052.
- [7] LI J C, RUI X L, XU L, et al. Enhanced therapeutic effect on colitis with powder formulations of Painong San associated with the promotion of intestinal adhesion and absorption[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 289: 115030. DOI:10.1016/j.jep.2022.115030.
- [8] 杨颖, 王昊, 黄清, 等. 健脾补督汤联合美沙拉嗪对缓解期溃疡性结肠炎患者的临床疗效[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3023-3027. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.016.
- [9] MILLER T L, LEE D, GIEFER M, et al. Nutritional therapy in very early-onset inflammatory bowel disease: a case report[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2017, 62(8): 2196-2200. DOI:10.1007/s10620-017-4616-9.
- [10] 肖玉欣, 王楠, 王婧, 等. 鞣花酸和尿石素类代谢产物的生物活性及其对肠道健康的作用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 275-284. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210120-217.
- [11] 郭昊. 石榴提取物对角质形成细胞抗氧化、抗糖化、抗炎作用和Paget病研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020: 4-11; 28-37. DOI:10.27652/d.cnki.gzyku.2020.000341.
- [12] AVRAMIA I, AMARIEI S. Formulation, characterization and optimization of β -glucan and pomegranate juice based films for its potential in diabetes[J]. Nutrients, 2022, 14(10): 2142. DOI:10.3390/nu14102142.
- [13] YANG Jieping, GERMANO P M, OH S W, et al. Pomegranate extract improves colitis in IL-10 knockout mice fed a high fat high sucrose diet[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2022, 66(5): 2100730. DOI:10.1002/mnfr.202100730.
- [14] GEORGE N S, CHEUNG L, LUTHRIA D L, et al. Pomegranate peel extract alters the microbiome in mice and dysbiosis caused by *Citrobacter rodentium* infection[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(8): 2565-2576. DOI:10.1002/fsn.31106.
- [15] PARISIO C, LUCARINI E, MICHELI L, et al. Pomegranate mesocarp against colitis-induced visceral pain in rats: effects of a decoction and its fractions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4304. DOI:10.3390/ijms21124304.
- [16] 李国秀, 李建科, 马文哲. 三种来源的石榴多酚抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 109-112. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.05.079.
- [17] SEERAM N P, ADAMS L S, HENNING S M, et al. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(6): 360-367. DOI:10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.
- [18] WANG Guoliang, YANG Xiaoyue, WANG Jing, et al. Walnut green husk polysaccharides prevent obesity, chronic inflammatory responses, nonalcoholic fatty liver disease and colonic tissue damage in high-fat diet fed rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 879-898. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.047.
- [19] ÁLVAREZ-CERVANTES P, IZQUIERDO-VEGA J A, MORÁN-LEÓN J, et al. Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice[J]. Toxicology Research, 2021, 10(2): 312-324. DOI:10.1093/toxres/tafab013.
- [20] 马琪, 翁与竟, 李佳, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎模型小鼠的疗效评价[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 785-792. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.010.
- [21] DUAN S N, DU X H, CHEN S X, et al. Effect of vitexin on alleviating liver inflammation in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 121: 109683. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109683.
- [22] ZHONG Y B, XIAO Q P, LI S S, et al. Bupi Yichang Pill alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by regulating the homeostasis of follicular helper T cells[J]. Phytomedicine, 2022, 100: 154091. DOI:10.1016/j.phymed.2022.154091.
- [23] ZHAO Y N, CHEN H, LI W T, et al. Selenium-containing tea polysaccharides ameliorate DSS-induced ulcerative colitis via enhancing the intestinal barrier and regulating the gut microbiota[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 209: 356-366. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.028.
- [24] ZHANG R J, YUAN S J, YE J F, et al. Polysaccharide from flammulina velutipes improves colitis via regulation of colonic microbial dysbiosis and inflammatory responses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1252-1261. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.044.
- [25] 杨超, 刘婧, 钟瑞, 等. 栀子有效部位的溃疡性结肠炎活性及其化学成分研究[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(2): 263-269. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2021.02.021.
- [26] YANG B, CHEN H Q, GAO H, et al. Bifidobacterium breve CCFM683 could ameliorate DSS-induced colitis in mice primarily via conjugated linoleic acid production and gut microbiota modulation[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 61-72. DOI:10.1016/j.jff.2018.08.014.
- [27] 田亚丽, 王芳, 田东惠, 等. 粪菌移植对坏死性小肠结肠炎新生小鼠肠道菌Th1/Th2细胞因子表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(2): 149-153. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2022.02.004.
- [28] PIECHOTA-POLANCZYK A, FICHNA J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2014, 387: 605-620.
- [29] AW T Y. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 204(3): 320-328. DOI:10.1016/j.taap.2004.11.016.
- [30] CHEN Y F, ZHENG J J, QU C, et al. Inonotus obliquus polysaccharide ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis involving modulation of Th1/Th2 and Th17/Treg balance[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 757-766. DOI:10.1080/21691401.2019.1577877.
- [31] ZHAO Ruiqi, LONG Xingyu, YANG Junqi, et al. Pomegranate peel polyphenols reduce chronic low-grade inflammatory responses by modulating gut microbiota and decreasing colonic tissue damage in rats fed a high-fat diet[J]. Food & Function, 2019, 10(12): 8273-8285. DOI:10.1039/C9FO02077B.
- [32] SOKOL H, SEKSIK P, FURET J P, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2009, 15: 1183-1189. DOI:10.1002/ibd.20903.
- [33] 曹晖, 吴东升, 张彧, 等. 基于高通量测序技术研究芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(1): 61-66. DOI:10.19879/j.cnki.1005-5304.202006249.
- [34] OKAMOTO T, SASAKI M, TSUIKAWA T, et al. Preventive efficacy of butyrate enemas and oral administration of *Clostridium butyricum* M588 in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats[J]. Journal of Gastroenterology, 2000, 35(5): 341-346. DOI:10.1007/s005350050358.
- [35] WAN Y, WANG F L, YUAN J H, et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial[J]. Gut, 2019, 68(8): 1417. DOI:10.1136/gutjnl-2018-317609.
- [36] YE Z, CAO C, LI Q, et al. Different dietary lipid consumption affects the serum lipid profiles, colonic short chain fatty acid composition and the gut health of Sprague Dawley rats[J]. Food Research International, 2020, 132: 109117. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109117.
- [37] 尹珊珊, 马红, 姜琦, 等. 安石榴苷通过SIRT1/PGC-1 α /NRF1通路对实验性结肠炎小鼠肠黏膜损伤的影响及其机制[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(8): 655-664. DOI:10.13431/j.cnki.immunol.j.20220090.
- [38] ROSILLO M A, SÁNCHEZ-HIDALGO M, CÁRDENO A, et al. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats[J]. Pharmacological Research, 2012, 66(3): 235-242. DOI:10.1016/j.phrs.2012.05.006.
- [39] LARROSA M, GONZÁLEZ-SARRÍAS A, YÁÑEZ-GASCÓN M J, et al. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2010, 21(8): 717-725. DOI:10.1016/j.jnutbio.2009.04.012.